FICHE TECHNIQUE

# BOUILLON LACTOSE BILIE AU VERT BRILLANT (BLBVB)

Réf. BK002HA – BM01108

## 1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon lactosé bilié au vert brillant est utilisé pour la confirmation des coliformes et des coliformes thermotolérants dans les produits alimentaires, les eaux d'alimentation et les eaux résiduaires. Il est aussi utilisé comme milieu de dénombrement des coliformes dans les glaces et crèmes glacées.

## 2 HISTORIQUE

Les recherche et mise au point d'un milieu de culture, inhibant les microorganismes autres que les coliformes, ont depuis longtemps intéressé les bactériologistes. Dès 1926, Dunham et Schoenlein ont étudié les proportions de bile et de vert brillant susceptibles de donner de bons résultats. Dans ses travaux, Jordan a montré la supériorité de ce milieu comparativement au bouillon lactosé pour la détection des coliformes dans l'eau.
Pour le contrôle de la pasteurisation du lait, MacCrady et Langevin ont utilisé avec satisfaction le bouillon lactosé à la bile et au vert brillant pour la détection des coliformes. Mackenzie a vérifié que la teneur en vert brillant est suffisante pour inhiber effectivement la culture d'anaérobies fermentant le lactose et en particulier *Clostridium perfringens*.

## 3 PRINCIPES

- La présence simultanée de bile de bœuf et de vert brillant provoque l'inhibition de la presque totalité des microorganismes à Gram-positif et des bactéries à Gram-négatif autres que les coliformes.
- La teneur en vert brillant est spécialement déterminée afin d'empêcher la croissance des anaérobies fermentant le lactose à 44°C, ce qui évite l'obtention de résultats faussement positifs.
- Le développement des coliformes se manifeste par l'apparition d'une turbidité, associée à une production de gaz dans la cloche de Durham par suite de la fermentation du lactose.

## 4 PREPARATION

- Mettre en solution 40,0 g de milieu déshydraté (BK002) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes contenant une cloche de Durham.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Après refroidissement, les cloches de Durham ne doivent pas contenir d'air.
- Refroidir le milieu à 25 °C.

**40,0 g/L**

**15 min à 121°C**

**NOTA** : Le bouillon double concentration peut être utilisé pour certaines applications spécifiques.
Dissoudre 80 g/L de milieu déshydraté et stériliser 15 minutes à 121°C



Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

## 5 MODE D'EMPLOI

**Analyse des glaces et crèmes glacées**

- Ensemencer les tubes de bouillon préparés ou de milieu prêt-à-l'emploi (BM011) avec 1 mL d'inoculum et de ses dilutions décimales successives.
- Incuber pendant 48 heures à 30°C

**Inoculum 1 mL**

**48 h à 30°C**

**Recherche et le dénombrement des coliformes (NPP) (ISO 4831)**

- Repiquer une anse des bouillons Laurylsulfate Tryptose simple et double concentration dans les tubes de bouillon préparés ou de milieu prêt-à-l'emploi (BM011).
- Incuber pendant 24 ± 2 heures à 30°C ou à 37°C, suivant les accords.
- Si la production de gaz n'est pas observée à ce stade, poursuivre l'incubation jusqu'à 48 ± 2 heures.

**Inoculum 1 anse**

**Incubation 30°C ou 37°C**

**Dénombrement des coliformes - Méthode par comptage des colonies (ISO 4832)**

- Repiquer 5 colonies obtenues sur gélose VRBL dans les tubes de bouillon préparés ou de milieu prêt-à-l'emploi (BM011).
- Incuber pendant 24 ± 2 heures à 30°C ou à 37°C, suivant les accords.

**Repiquage 5 colonies**

**Incubation 30°C ou 37°C**

**Recherche et dénombrement des coliformes et coliformes thermotolérants (NPP) (NF T 90-413)**

- Repiquer une anse du bouillon présomptif dans les tubes de bouillon ainsi préparés ou de milieu prêt-à-l'emploi (BM011).
- Incuber :
  - à 37°C ± 1°C pendant 48 heures pour les coliformes.
  - à 44 ± 0.5°C pendant 48 heures pour les coliformes thermotolérants.

**Inoculum 1 anse**

**Incubation 37°C ou 44°C**

## 5 LECTURES

La fermentation du lactose se traduit par l'apparition de gaz dans les cloches de Durham (volume au minimum égal au 1/10ème du volume de la cloche) en moins de 48 heures. Elle indique la présence de coliformes.

## 6 FORMULE - TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)



Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France

Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

Pour 1 litre de milieu :
- Tryptone ..... 10,0 g
- Bile de bœuf bactériologique..... 20,0 g
- Lactose..... 10,0 g
- Vert brillant ..... 13,3 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

## 7 CONTROLE QUALITE

- Milieu déshydraté : poudre verdâtre, fluide et homogène.
- Milieu préparé à simple concentration : solution verte, limpide.
- Réponse culturale de croissance après 24 à 48 h d'incubation à 30°C (**ISO/TS 11133-2/A1**) :

| Microorganismes | | Croissance | Production de gaz |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | WDCM 00013 | excellente, score 2 | ≥ 5 mm (tube Durham) |
| *Citrobacter freundii* | WDCM 00006 | excellente, score 2 | ≥ 5 mm (tube Durham) |
| *Enterococcus faecalis* | WDCM 00087 | partiellement inhibée, score 0-1 | négative |
| *Staphylococcus aureus* | WDCM 00034 | inhibée, score 0 | |

- Réponse culturale de croissance après 48 h d'incubation à 37°C (**NF T 90-461**) :

| *Microorganismes* | | Croissance | Production de gaz |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | WDCM 00179 | Bonne | ≥ 5 mm (tube Durham) |
| *Enterococcus faecalis* | WDCM 00176 | inhibée | négative |

## 8 STOCKAGE - CONSERVATION

**Milieu déshydraté :** 2-30°C
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

**Milieu préparé (à titre indicatif) :**
- 3 mois à 2-8°C, à l'abri de la lumière (à titre indicatif).

**Milieu prêt-à-l'emploi en tubes avec cloches de Durham,**
- Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
- Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

## 9 PRESENTATION

**Milieu prêt-à-l'emploi (simple concentration) en tubes avec cloches de Durham :**
- Coffret de 50 tubes de 10 mL BM01108

**Milieu déshydraté :**
- Flacon de 500 g BK002HA



Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

## 10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


DUNHAM, H.G. and SCHOENLEIN , H.W.. 1926. Stain Technology, **1** : 129.

JORDAN. 1927. Journal of American Water Works Association, **18** : 337.

McCRADY and LANGEVIN. 1932. Journal of Dairy Science, **15** : 321.

MACKENZIE, E.F.W., TAYLOR, W.E., and GILBERT, W.E.. 1948. Recent experiments in the rapid identification of *Bacterium coli* type I. Journal of General Microbiology, **2** : 197-204.

Rodier, J. 1984. L'analyse de l'eau. Dénombrement des coliformes, coliformes fécaux, et *Escherichia coli* présumés. Dunod 7ème Ed., 793-798.

Journal Officiel du 21 Septembre 1968. Méthodes officielles de prélèvement et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées (Arrêté du 30 Août 1968).

NF ISO 4831 (V 08-016). Octobre 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes. Technique du nombre le plus probable.

NF ISO 4832 (V 08-015). Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.

NF T 90-413. Octobre 1985. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

NF T 90-461/A2. Mai 2007. Qualité de l'eau. Microbiologie. Contrôle qualité des milieux de culture.

ISO/TS 11133-2/A1. Février 2011. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture. AMENDEMENT 1: Micro-organismes pour essai recommandés pour les milieux de culture les plus usuels


## 11 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

| | | |
|---|---|---|
| Code document | : | BK002/F/2003-01 : 7 |
| Date création | : | 01-2003 |
| Dernière mise à jour | : | 28-10-2011 |
| ***Motif de la révision :*** | | **Remaniement général** |
| | | **Corrections § 4 : Préparations** |
| | | **Corrections § 5 : Mode d'emploi** |
| | | **Corrections § 7 : référence WDCM des souches de contrôle** |




Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France

Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr